

7

Mutagénicité et génotoxicité expérimentales

L'étude de la génotoxicité des éthers de glycol relève d'une préoccupation récente, née de la description par Nagano en 1979 d'effets d'atrophie testiculaire chez la souris. Ces effets avaient déjà été notés par d'autres auteurs, notamment par Wiley en 1938. La question posée était celle de la cancérogénicité potentielle de ces substances. En l'absence de résultats d'études épidémiologiques et d'expérimentations à long terme chez l'animal, il convenait en première approche d'évaluer les potentialités mutagènes et génotoxiques de ces substances à l'aide des modèles cellulaires validés à cet effet.

Les études ont porté essentiellement sur les premiers représentants de la série des éthers de l'éthylène glycol, comme l'EGME, l'EGEE et l'EGBE. Ce choix était justifié par la toxicité expérimentale de ces substances et par leur utilisation alors très importante en tant que solvants. En l'absence d'effets mutagènes des éthers de l'éthylène glycol sur les modèles *in vitro* classiques, les recherches se sont orientées vers l'étude de leurs métabolites, la formation de métabolites plus actifs que la molécule mère ayant été décrite par Miller et coll. dès 1982. La gamme des essais mis en œuvre et des critères étudiés s'est simultanément élargie et ouverte à des approches moins conventionnelles, intégrant l'utilisation de cellules testiculaires par exemple, ou l'étude des interactions avec d'autres substances chimiques.

Il apparaît actuellement que les éthers de l'éthylène glycol ne sont pas intrinsèquement mutagènes ou clastogènes. Ils induisent cependant des effets d'aneuploïdie, la formation de micronoyaux et les échanges entre chromatides sœurs, et interfèrent avec les systèmes d'agrégation de la tubuline. Ces effets témoignent d'un caractère génotoxique susceptible de rendre compte de leur toxicité sur la reproduction. La toxicité des éthers de l'éthylène glycol est liée à leurs métabolites, aldéhydes intermédiaires et acides, formés par la voie de l'alcool et de l'aldéhyde déshydrogénases.

Les dérivés du propylène glycol ont fait l'objet de peu d'études publiées, mais les quelques représentants étudiés parmi ceux métabolisés par déalkylation sont dépourvus des effets de génotoxicité caractéristiques des dérivés de l'éthylène glycol.

Les expérimentations à long terme chez l'animal font défaut pour juger du caractère cancérigène de ces dérivés. Des résultats récents classent l'EGBE parmi les cancérigènes potentiels.

Modèles d'étude utilisés *in vitro* et *in vivo*

Les études ont été conduites à l'aide des systèmes cellulaires classiquement utilisés et normalisés à cet effet, comprenant :

- les mutants bactériens, dont le type est représenté par les mutants *Salmonella typhimurium* his⁻ développés par Ames et ses collaborateurs ;
- les lignées de cellules de mammifères (cellules d'ovaires d'hamster chinois, CHO, lignées fibroblastiques V79) ou les mutants correspondants (CHO hprt-...);
- les cultures primaires de cellules de mammifères, de type SHE (cellules embryonnaires d'hamster syrien, normales et diploïdes), les cellules lymphocytaires d'origine humaine (HL) ;
- les cocultures de cellules testiculaires de rat, étudiées pour répondre à la problématique spécifique des éthers de glycol.

Les critères de mutagénicité et de génotoxicité, comprenant dommages à l'ADN, aberrations chromosomiques, micronoyaux, aneuploïdie, synthèse non programmée de l'ADN, ont été complétés par l'étude de critères témoignant d'une instabilité génomique (échanges de chromatides sœurs) ou d'une potentialité cancérigène *in vitro* par un mécanisme génotoxique ou épigénétique (inhibition des communications entre cellules *via* les jonctions « gap », transformation cellulaire) (tableaux 7.I et 7.II).

Les études *in vitro* sont très intéressantes pour étudier la toxicité cellulaire des éthers de glycol et celle de leur métabolites qui serait par ailleurs impossible à évaluer à partir d'études *in vivo*, les intermédiaires réactifs ne pouvant par définition être trouvés *in vivo*. Les essais cellulaires ont des limites toutefois, qui tiennent à l'impossibilité de rendre compte de la biodisponibilité, de la toxicocinétique des substances étudiées, et du contexte physiologique, paramètres qui influencent considérablement la réponse d'un organisme à une substance potentiellement toxique. Les modèles *in vitro* figurent parmi les outils indispensables en première approche qui doivent être complétés par des études *in vivo*, afin de confirmer les présomptions de toxicité qu'ils auraient permis d'identifier.

Les modèles *in vivo* utilisés pour les éthers de glycol sont ceux préconisés pour la détection de potentialités génotoxiques lors d'essais à relativement court terme : modèles mammifères ou invertébrés (tableaux 7.I et 7.III). Les études ont porté sur les cellules somatiques pour la recherche des dommages à l'ADN, ou sur les cellules germinales pour la recherche des anomalies morphologiques, et des effets sur la fertilité ou l'implantation des embryons (test du dominant létal). Certaines des expérimentations sur mammifères ont été

Tableau 7.1 : Principaux modèles et critères biologiques appliqués à l'étude de la génotoxicité des éthers de glycol

Essais	Modèles et critères biologiques	
<i>In vitro</i>	Bactéries Mutation réverse (test d'Ames)	
	Cellules de mammifères Mutation génique Synthèse non programmée de l'ADN (SNP) Échanges de chromatides sœurs (ECS) Aberrations chromosomiques (AC) Aneuploïdie Micronoyaux (MN) Inhibition des communications intercellulaires (ICI) Transformation morphologique	
	Cellules germinales Anomalies morphologique, numérique	
	<i>In vivo</i>	Invertébrés Drosophile
		Mammifères : souris b6c 3f1, rat <i>sprague dawley</i> , hamster (par gavage, <i>per os</i> , ou par inhalation) Effets clastogènes Fonction ovarienne ou testiculaire (fertilité, nbre d'implantations, embryotoxicité)

simultanément mises à profit pour étudier les fonctions hormonales, ovariennes ou testiculaires. Les études directes d'effets mutagènes ou génotoxiques sur les cellules germinales sont rares. Le test des comètes, développé récemment pour mesurer les dommages à l'ADN de toutes les cellules individualisées indépendamment de l'étape de leur cycle cellulaire, se prêterait maintenant à ce type d'étude.

Mutagénicité et génotoxicité *in vitro*

Les études de cytotoxicité préalables aux essais de génotoxicité ont souligné la cytotoxicité élevée des métabolites aldéhydiques, par rapport aux métaboliques acides et aux éthers de l'éthylène glycol. La cytotoxicité des aldéhydes se manifeste à des concentrations de l'ordre de 0,1 à 1 mM, tandis que celle des acides alkoxyacétiques est observée pour des concentrations dix fois plus élevées ; la toxicité des éthers de glycol « parents » se produit à des concentrations encore supérieures pouvant dépasser 100 mM (Ma et coll., 1993 ; Elias et coll., 1996). Cette échelle de toxicité est en rapport avec le niveau des concentrations effectives des éthers de glycol en termes de génotoxicité.

L'étude bibliographique, dont les résultats sont synthétisés dans le tableau 7.IV et détaillés dans le tableau 7.II, permet d'établir les profils d'activité suivants pour les dérivés de l'éthylène glycol :

Tableau 7.II : Tableau récapitulatif des principales études *in vitro* (incluant micronoyaux/souris) relatives à la génotoxicité des éthers de glycols : résultats positifs donnés avec la LOAEC (concentration la plus basse induisant des effets adverses significatifs) ou avec la gamme des concentrations positives

Produit	Origine pureté	Modèle expérimental	Critères ou type d'essai	Gamme de concentrat. testées	Résultats	LOAEC ou concentrat. positives	Auteurs	
EGME	Aldrich	S typhimurium	mutation réverse	jusqu'à 33 mg/bte	-	25 ppm	McGregor et coll., 1983	
		TA 1535,1537,1538, TA 98,100	SNP	jusqu'à 10 mg/ml pt 3 h	-			
		fibroblastes humains	mutation létale	1 h à 25 ppm/air	douteux			
		drosophile	récessive liée au sexe	5 h à 500 ppm/air	-			
		cellules testiculaires rat (coculture)	morphologie, attach.	jusqu'à 50 mM/72 h	-			Gray, 1985
		CHO-K1-BH4	mutation hprt/X	50-1 000 mM	-			Ma et coll., 1993
		CHO-AS52	mutation gpt	-	-			
		lymphocytes humains	ECS/AC	10-125 mM/1 h	-			Chiewchanwit et Au, 1994
				1 - 600 mM/24 h	+			150 et 300 mM
				ECS	1 - 100 mM			-
		cycle cellulaire		+	1 mM retard cycle			
	Merck > 99 %	S. typhimurium TA97a, 98,100,102	mutation réverse	jusqu'à 10 mg/bte	-		Hoflack et coll., 1995	
	cellosol	lymphocytes humains	AC, ECS	500 - 3 000 ppm	-	500 ppm	Villalobos-Pietrini et coll., 1989	
		V79, lymphocytes humains	mutation, ECS,AC	500 - 1 500 ppm	+			
		V79	micronoyaux	65-260 mM	-			65 mM
		SHE	aneuploïdie		+			130 mM
			inhib. coop. métab. transformation cell		+			130 mM
				-				
MALD		CHO-K1-BH4	mutation hprt/X	1-20 mM	-	5 - 20 mM	Ma et coll., 1993	
		CHO-AS52	mutation gpt		+			
		CHO-K1-BH4	AC	5 - 20 mM	+			10 - 20 mM
		CHO-AS52	AC	1 - 20 mM	+			5 - 10 mM
		lymphocytes humains	AC	10 - 60 mM/1 h	+			40 mM
			ECS	0,05 - 5 mM/24 h	+			0,5 - 2,5 mM
				10 - 30 mM/1 h	+			20 et 30 mM
		0,05 - 1 mM/24 h	+	0,5 et 1 mM				

Tableau 7.II (suite)

Produit	Origine pureté	Modèle expérimental	Critères ou type d'essai	Gamme de concentrat. testées	Résultats	LOAEC ou concentrat. positives	Auteurs
	TCI.US 87 %	S. typhimurium TA 98, 100,102 TA 97a V79 lymphocytes humains, V79 V79 SHE	mutation réverse	jusqu'à 7 mg/bte	- +	2,5 mg/bte	Hoflack et coll., 1995 Elias et coll., 1996
			mutation, ECS	0,1 - 8 mM	+	1 mM (mut) 0,2 (ECS)	
			AC	0,1 - 0,3 mM	+	0,2 mM	
			micronoyaux aneuploïdie		+	0,12 mM	
			inhib. coop. métab. transformation cell		- +	0,1 mM	
MAA		CHO-K1-BH4 CHO-AS52 lymphocytes humains cellules testiculaires rat (coculture)	mutation hprt/X mutation gpt	5 - 200 mM	- -		Ma et coll., 1993
			ECS cycle cellulaire	0,1 - 10 mM	+	1 - 10 mM 0,1 mM retard cycle	Arashidani et coll., 1998
			morphologie, attach.	2 - 10 mM	+	2 mM	Gray et coll., 1985 ; Gray, 1986
	Merck > 99 %	S. typhimurium TA97a, 98,100,102 V79, lymphocytes humains V79	mutation réverse	jusqu'à 2 mg/bte	-		Hoflack et coll., 1995
			mutation, AC micronoyaux aneuploïdie inhib. coop. métab	1,6 - 6,4 mM	- + + -	6,4 mM 1,4 mM	Elias et coll., 1996
EGMEA		Saccharomyces cerevisiae microtubuline porcine	induc aneuploïdie	2,9 - 5,7 %	+	2,9 - 5,7 %	Zimmerman et coll., 1985
			accélération agrég	0,1 - 0,5 µl/300 µl tubu- line	+	0,01 % (v/v)	Gröschel-Stewart et coll., 1985
EGEE	carbitol	hamster chinois, moelle osseuse cellules testiculaires rat (coculture) S. typhimurium TA97a, 98,100,102 Saccharomyces cerevisiae rat Swiss albino, moelle osseuse	micronoyaux/PE morphologie, attach.	1 333 mg/kg ip/12-72 h jusqu'à 50 mM/72 h	- -		Basler, 1986 Gray, 1985
			mutation réverse col.convertants	jusqu'à 1 ml/bte 1 et 10 %	- +	10 % faible ↗	Berté et coll., 1986
			révert. cross.over micronoyaux	2 ml/kg/j	- -		

Tableau 7.II (suite)

Produit	Origine pureté	Modèle expérimental	Critères ou type d'essai	Gamme de concentrat. testées	Résultats	LOAEC ou concentrat. positives	Auteurs
	cellosol	lymphocytes humains	AC, ECS	500 - 3 000 ppm 250 - 1 500 ppm	- +	250 ppm	Villalobos-Pietrini et coll., 1989
	Merck > 99 %	S. typhimurium TA97a, 98,100,102	mutation réverse	jusqu'à 9 mg/bte	-		Hoflack et coll., 1995
		V79, lymphocytes humains	mutation, AC	25 - 170 mM	-		Elias et coll., 1996
		V79	ECS	1 300-3 000 mg/kg pc/ip	+	35 mM	
		SHE	micronoyaux		+	111 mM	
		souris, moelle osseuse	aneuploïdie		+	30 mM	
			inhib. coop. métab.		+	55 mM	
			transformation cell micronoyaux		-		
EALD	Synth 93 %	S. typhimurium TA97a, 98,100,102	mutation réverse	jusqu'à 10 mg/bte	-		Hoflack et coll., 1995
		V79	mutation	0,25 - 0,85 mM	-		Elias et coll., 1996
		V79, lymphocytes humains	ECS		+	0,5 mM	
		V79	AC		+	0,35 mM	
		V79	micronoyaux		+	0,28 mM	
		SHE	aneuploïdie		+	0,6 mM	
			inhib. coop. métab.		-		
			transformation cell		-		
EAA		cellule testiculaires rat (coculture)	morphologie, attach.	2 - 10 mM	+	5 mM	Gray et coll., 1985 Gray, 1986
	Merck 97 %	S. typhimurium TA97a, 98,100,102	mutation réverse	jusqu'à 2 mg/bte	-		Hoflack et coll., 1995
		V79, lymphocytes humains	mutation, ECS, AC	2,5 - 10 mM	-		Elias et coll., 1996
		V79	micronoyaux	25 - 200 mg/kg ip	+	10 mM	
		V79	aneuploïdie		+	0,12 mM	
		souris	inhib. coop. métab.		-		
			micronoyaux		-		

Tableau 7.II (suite)

Produit	Origine pureté	Modèle expérimental	Critères ou type d'essai	Gamme de concentr. testées	Résultats	LOAEC ou concentr. positives	Auteurs	
DEGME	Aldrich	S. typhimurium TA 1535,1537,1538, TA 98,100 fibroblastes humains drosophile	mutation réverse	jusqu'à 94 mg/bte	-	250 ppm (mâles)	McGregor et coll., 1983	
			SNP	jusqu'à 19 mg/ml pt 3 h	-			
EGBE	Techn. 99,4 %	CHO hépatocytes rat	mutation létale récessive liée au sexe	2,75 h à 250 ppm/air	douteux			
			mutations	0,06-1 %	-		UCC, 1980	
			ECS	0,01-0,25 %	-			
	cellosol	bacteriophage TD4 lymphocytes humains	SNP	(0,1-100).10 ⁻³ %	+	10 ⁻³ et 0,1.10 ⁻³ %		
			mutations	19 - 111 µg/ml	-		Kvelland, 1988	
			AC	500 - 3 000 ppm	-		Villalobos-Pietrini et coll., 1989	
	Merck > 99 %	CHO-AS52 S. typhimurium TA 98, 100,102, TA97a	ECS	0,38 - 38 mM	+	500 ppm	Chiewcharvit et Au, 1995	
			mutation	0,38 - 38 mM	-		Hoflack et coll., 1995	
			mutation réverse	jusqu'à 14 mg/bte	-	4,4 mg/bte		
	Dow 99 %	S. typhimurium TA 97a	mutation reverse	0,5 à 10 mg/bte	-		Gollapudi et coll., 1996	
			V79, lymphocytes humains	AC	8 - 80 mM	-		Elias et coll., 1996
			V79	mutation, ECS	150-1 000 mg/kg pc/ip	+	20 (mut) 15(ECS) mM	
SHE			micronoyaux		+	8 mM		
souris			aneuploidie		+	10 mM		
			inhib. coop. métab. transformation cell micronoyaux		+	8,5 mM		
BALD	Synth 91 %	CHO-AS52 S. typhimurium TA97a, 98,100,102	mutation	0,008 - 0,26 %	-		Chiewcharvit et Au, 1995	
			mutation réverse	jusqu'à 7 mg/bte	-		Hoflack et coll., 1995	
	V79, lymphocytes humains	V79 SHE	mutation	0,04 - 8 mM	+	1,5 mM	Elias et coll., 1996	
			ECS		+	0,5 mM		
			AC		+	0,15 mM		
			micronoyaux		+	0,04 mM		
			aneuploïie		+	0,1 mM		
			inhib. coop. métab. transformation cell		-			

Mutagenicité et génotoxicité expérimentales

Tableau 7.II (suite)

Produit	Origine pureté	Modèle expérimental	Critères ou type d'essai	Gamme de concentr. testées	Résultats	LOAEC ou concentr. positives	Auteurs
BAA	Janssen	cellules testiculaires rat (coculture) S. typhimurium TA97a, 98,100,102 V79, lymphocytes humains V79 souris	morphologie, attach.	2 - 10 mM	-		Gray, 1986 Hoflack et coll., 1995 Elias et coll., 1996
			mutation réverse	jusqu'à 1 mg/bte	-		
			mutation, ECS, AC	2,5 - 10 mM	-		
			micronoyaux	50 - 200 mg/kg pc/ip	+	5 mM	
			aneuploïdie		+	0,4 mM	
			inhib. coop. métab.		-		
DEGBE		S. typhimurium 98,100, 1535, 1537,1538 L5178Y TK+ /- hépatocytes de rat CHO	mutation réverse	jusqu'à 20 µl/bte	-		Thompson et coll., 1984
			mutation	jusqu'à 7,5 µl/ml	-		
			SNP	jusqu'à 10 µl/ml	-		
			essai cytogénétique	4,5 - 8 µl/ml	-		
			mutation létale	14 000 ppm/inj.	-		
			récessive liée au sexe	11 000 ppm/per os	-		
	Dow 99,5 %	souris CD-1, moelle osseuse	mutation hprt	1 - 5 mg/ml	-	sans S9	Gollapudi et coll., 1998
			micronoyaux	330 - 3 300 mg/kg per os	douteux	3 mg/ml avec S9	
					-		
					-		
2PG1ME	V79, lymphocytes humains V79 SHE souris	mutation, AC	10 - 60 mM	-		Elias et coll., 1996	
		ECS	2 500-6 000 mg/kg pc/ip	+	30 mM		
		micronoyaux		-			
		aneuploïdie		-			
		inhib. coop. métab.		+	28 mM		
		transformation cell		-			
2PG1BE	V79, lymphocytes humains V79 SHE	mutation, ECS, AC		-		Elias et coll., 1996	
		micronoyaux		-			
		inhib. coop. métab.		-			
		transformation cell		-			
DPGBE	V79 lymphocytes humains V79 SHE souris	mutation, ECS, AC	10 - 20 mM	-		Elias et coll., 1996	
		micronoyaux	100 - 400 mg/kg pc/ip	-			
		inhib. coop. métab.		+	11 mM		
		transformation cell		-			
		micronoyaux		-			

SHE : cellules embryonnaires d'hamster syrien ; CHD : cellules d'ovaire d'hamster chinois ; V79 : lignée fibroblastique ; SNP : synthèse non programmé d'ADN ; ECS ; échange de chromatides sœurs ; AC : aberrations chromosomiques ; MN : micronoyaux ; ICI : inhibition des communications intercellulaires ; MALD, EALD, BALD : aldéhydes dérivés de l'EGME, de l'EGEE et de l'EGBE, respectivement ; MAA, EAA, BAA : acides méthoxy-, éthoxy- et butoxy-acétiques, respectivement

Tableau 7.III : Tableau récapitulatif des principales études *in vivo* en relation avec l'étude de la génotoxicité des éthers de glycols

Produit	Modèle expérimental	Cibles	Critères ou type d'essai	Gamme de concentrations testées	Résultats	LOAEC ou concentrat. positives	Auteurs
EGME	Rat Sprague Dawley	moelle osseuse	cytogénétique	25 et 500 ppm/inhalation 7 h/j pt 1 ou 5 j	-/mâles	fem. 25 ppm	McGregor et coll., 1983
		fécondation nbre implantations	dominant léthal	7 h/j pt 5 j	+	500 ppm (sem 4 à 8) (↘ impl. sem 3 à 8)	
	Souris B6C3F1 mâles	sperme	anomalies morphologiques	7 h/j pt 5 j	+	500 ppm	
	Rat CD	fertilité	dominant léthal	30, 100, 300 ppm inhalation 6 h/j, 5 j/sem/13 semaines	+	300 ppm fertilité supprimée rétablie après 13 sem.	McGregor et coll., 1984
	Souris	moelle osseuse	ECS	500 – 1 000 mg/kg ip	+	500 – 1 000 mg/kg	Arashidani et coll., 1998
	Souris B6C3F1	moelle osseuse	AC	35 - 1 900 mg/kg/os, iv	-		Au et coll., 1993
		cellules germinales	spermatocytes spermatides		+	↘ nbre dès 35 mg/kg	Au et coll., 1996
Rat Sprague Dawley	moelle osseuse	altération ADN/Comet	500, 1 000, 1 500 mg/kg pc per os	+	500, 1 000, 1 500 mg/kg/2 semaines	Anderson et coll., 1996	
	testicules	après 2 semaines après 5 et 6 semaines		+ -			
MALD	Souris B6C3F1	moelle osseuse	AC	20 - 2 000 mg/kg /os, iv	-		Au et coll., 1993
		cellules germinales	spermatocytes spermatides		+	↘ nbre dès 20 mg/kg	Au et coll., 1996
DEGME	Rat Sprague Dawley	moelle osseuse	cytogénétique	250 et 1 000 ppm/ inhalation 7 h/j pt 5 j	+	250 ppm mâles (légère ↗ aberrations)	McGregor et coll., 1983
		fécondation nbre implantations	dominant léthal		+	1 000 ppm (sem 4 à 9) récupération à sem 10	
	Souris B6C3F1	sperme	anomalies morphologiques	ld. (pt 4 j à 1 000 ppm)	+	1 000 ppm	

ECS ; échange de chromatides sœurs ; AC : aberrations chromosomiques ; MALD : aldéhyde dérivé de l'EGME

Tableau 7.IV : Effets génotoxiques des éthers de glycol et de leurs métabolites *in vitro* (incluant la comparaison des résultats des essais micronoyaux *in vivo* et *in vitro*)

Composé	Mutation		SNP	ECS	AC	Induction AC*	MicroN		Aneupl	ICI	TM
	B	M					<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>			
EGME	-	-	-	±	-	-	+	-	+	+	-
MALD	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
MAA	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
EGEE	-	-	-	+	-/+	+	+	-	+	+	-
EALD	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
EAA	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
EGBE	-/+	-	-	+,±	-	+	+	-	+	+	-
BALD	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
BAA	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
2PG1ME	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
2PG1BE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DPGBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

B : bactérie ; M : cellule de mammifère (HL, V79, CHO) ; SNP : synthèse non programmée d'ADN ; ECS : échanges de chromatides sœurs ; AC : aberrations chromosomiques ; MicroN : micronoyau ; Aneupl : aneuploïdie ; ICI : inhibition des communications intercellulaires ; TM : transformation morphologique ; * : - après 0,2 mM MMS ; MALD, EALD, BALD : aldéhydes dérivés de l'EGME, de l'EGEE et de l'EGBE, respectivement ; MAA, EAA, BAA : acides méthoxy-, éthoxy- et butoxy-acétiques, respectivement

- absence de caractère mutagène sur bactéries et cellules de mammifères des éthers de glycol et de leurs métabolites, à l'exception du MALD (aldéhyde dérivé de l'EGME) et de l'EGBE. Le MALD qui est le premier de la série des métabolites aldéhydiques, est responsable de mutations de type délétion (Ma et coll., 1993 ; Au et coll., 1996). Le MALD et l'EGBE ont donné des résultats positifs avec le test d'Ames, mais uniquement sur la souche *Salmonella typhimurium* his-TA97a et à doses très élevées, supérieures au mg/bte, ce qui laisse supposer que le risque mutagène est faible (Hoflack et coll., 1995). L'EGBE ne forme cependant pas d'adduits à l'ADN (Keith et coll., 1996). La présence de traces de peroxydes en tant qu'impuretés a été évoquée pour expliquer la mutagénicité trouvée avec l'EGBE (Gollapudi et coll., 1996) ;
- effets clastogènes des métabolites aldéhydiques responsables d'aberrations chromosomiques sur cellules de mammifères, à faible concentration (0,1-1 mM) ;
- propriété d'induire *in vitro* la formation de micronoyaux et des effets d'aneuploïdie partagée par tous les dérivés étudiés, substances parentes et métabolites ;

- induction d'échanges entre chromatides sœurs par la plupart des éthers de glycol et de leurs métabolites à l'exception des acides EAA (acide éthoxyacétique) et BAA (acide butoxyacétique) ;
- effets inhibiteurs de certains éthers de glycol sur la communication intercellulaire à concentrations très élevées (> 100 mM).

Le niveau des concentrations auxquelles les substances agissent, est en général de l'ordre de 0,1 à 1 mM pour les aldéhydes, et de 1 à 10 mM pour les métabolites acides. En revanche, les éthers de glycol exercent leur effets à des concentrations élevées de l'ordre de 10 à 100 mM ou plus, soit nettement supérieures à celle de leurs métabolites. L'EGBE apparaît la substance la plus active comparée à ses homologues inférieurs, EGEE et EGME : ses effets se produisant à des concentrations voisines de 10 mM. Cet aspect relatif aux concentrations actives est souvent discuté par les auteurs, qui s'interrogent sur l'impact toxique réel des éthers de glycol et sur la probabilité que des concentrations cellulaires aussi élevées soient atteintes lors d'exposition professionnelle. En fait, comme les métabolites peuvent agir à des concentrations dix à cent fois plus faibles que les substances parentes, la toxicité des éthers de glycol est susceptible de se manifester dans ces conditions d'exposition.

Il a été démontré que la toxicité des dérivés de l'éthylène glycol était liée aux métabolites formés. Le blocage de la voie métabolique conduisant à l'aldéhyde annihile les effets testiculaires de l'EGME, tandis qu'une inhibition de la transformation de l'aldéhyde en acide modifie peu la toxicité (Foster et coll., 1984 ; Moss et coll., 1985). Ceci démontre l'implication des intermédiaires aldéhydiques dans la toxicité, au même titre que celle des métabolites acides (Foster et coll., 1986). Les acides sont souvent considérés comme les toxiques ultimes, parce que ce sont les métabolites retrouvés *in vivo*, alors que les aldéhydes sont trop réactifs pour être mis en évidence (Miller et coll., 1982 ; Foster et coll., 1983).

L'implication des métabolites dans la toxicité des éthers de l'éthylène glycol a été maintes fois vérifiée. Ainsi les cocultures de cellules testiculaires traitées par l'EGME, ou son métabolite acide MAA, ont confirmé les effets cytotoxiques du MAA (acide méthoxyacétique) à 2 mM sur la morphologie et la capacité d'adhésion des cellules, alors que l'EGME est sans effet à 50 mM (Gray et coll., 1985 ; Gray, 1986).

L'inhibition des communications et des échanges intercellulaires observée à concentrations élevées est la traduction d'effets épigénétiques. Cette inhibition pourrait être expliquée par une altération de la structure de la membrane cytoplasmique notée par Welsch et Stedman (1984b) dans le cas de l'EGME. L'aspect « bouillonnant » des contours cellulaires peut aussi traduire une modification du cytosquelette.

Aucun des effets génotoxiques précédents n'a été rapporté pour les dérivés du propylène glycol étudiés, 2PG1ME, 2PG1BE et DPG1BE (Elias et coll., 1996).

La formation des micronoyaux dans les cellules V79 peut être mise en relation avec les effets aneuploïdogènes des éthers de l'éthylène glycol (Aardema et coll., 1998). L'aneuploïdie observée sur les cellules V79 est très marquée avec les aldéhydes, beaucoup moins avec les acides ou les substances mères. Ce caractère aneuploïdogène a été détecté par ailleurs sur la levure, et *in vitro* par l'étude de l'inhibition de la condensation de la tubuline (Gröschel-Stewart et coll., 1985). Ces auteurs soulignent que les concentrations affectant l'agrégation de tubuline sont 100 fois plus faibles que celles requises pour l'induction de l'aneuploïdie. Bien que la valeur prédictive du test d'induction de l'aneuploïdie chez la levure soit contestée pour l'extrapolation aux mammifères notamment par Basler (1986), ces résultats mettent l'accent sur un mécanisme susceptible d'expliquer la toxicité des éthers de glycol sur les cellules en division rapide comme les spermatoocytes et les cellules embryonnaires.

Ce mécanisme n'expliquerait cependant qu'en partie la toxicité testiculaire. En effet, l'EGBE qui induit des effets d'aneuploïdie notables à des concentrations voisines de 15 mM *in vitro* semble dépourvu d'effets testiculaires *in vivo*.

L'induction des échanges entre chromatides sœurs (ECS) témoigne de la génotoxicité élevée des métabolites aldéhydiques, et à un degré moindre de celle des acides EAA et BAA, puis des éthers de glycol. Les ECS constituent un indicateur de génotoxicité unanimement reconnu, mais le mécanisme de ces échanges n'étant pas élucidé, ce critère n'apporte pas d'éclaircissement sur le mécanisme d'action des éthers de l'éthylène glycol (Tucker et coll., 1993).

D'autres mécanismes ont été invoqués pour expliquer les effets sur la reproduction et le développement, en particulier une interférence avec la synthèse *de novo* des bases puriques et pyrimidiques, très intense dans les tissus en prolifération (Melbus et Welsch, 1989). Une diminution de la biodisponibilité du carbone transféré par l'intermédiaire du tétrahydrofolate, nécessaire à cette synthèse, a été montrée avec le MAA : les effets bénéfiques d'une supplémentation en sérine, sarcosine ou glycofolate conforteraient cette hypothèse.

Des études sur les effets combinés des éthers de glycol et d'un alkylant comme le méthylméthane sulfonate (0,2 mM MMS) ont montré que EGEE, EGBE, 2PG1ME, non clastogènes en eux-mêmes augmentaient les dommages à l'ADN induits par MMS (Elias et coll., 1996). L'hypothèse que ces effets de synergie résultaient d'une inhibition de la réparation de l'ADN par les éthers de glycol a été confirmée ensuite avec EGBE (Hoflack et coll., 1997).

Les effets d'interaction des éthers de glycol avec d'autres substances potentiellement toxiques ont été mis en évidence par ailleurs dans une étude du MALD sur l'apoptose : appliqué seul, le MALD est sans effet sur l'apoptose, tandis qu'il inhibe ce processus de mort cellulaire à des concentrations aussi basses que 0,2 mM lorsqu'il est associé à des substances apoptotiques (Dhaluin et coll., 1999). Ces effets d'inhibition des processus apoptotiques sont en

relation avec l'augmentation de la transformation cellulaire observée sur les mêmes systèmes cellulaires dans des conditions identiques.

Les effets des éthers de glycol sur l'apoptose décrits dans différents travaux sont cependant contradictoires. En effet, Li et coll. (1996) rapportent une induction de l'apoptose dans les cellules de Sertoli après une exposition de 5 h à 5 mM MAA. Hoflack et coll. (1998) ont montré que 20 mM EGBE induisaient l'apoptose de lignées leucémiques humaines.

Ces résultats posent le problème des effets d'interaction des éthers de glycol, problème rarement abordé dans les expérimentations où les substances étudiées sont toujours administrées isolément. Cette question des effets d'interaction semble d'autant plus importante que les éthers de glycol sont des solvants pouvant favoriser la bioabsorption des autres composés toxiques auxquels ils peuvent être associés.

Génotoxicité *in vivo* à court terme des éthers de glycol

Les études sont récapitulées dans le tableau 7.III. Les études expérimentales à court terme sur mammifères ont confirmé la toxicité sur les cellules germinales de l'EGME sur le rat ou la souris et ses effets d'induction *in vivo* des échanges de chromatides sœurs, alors que les effets clastogènes sont moins constants.

Au et coll. (1993, 1996) n'ont observé aucun effet clastogène sur cellules de moelle osseuse de souris traitées par EGME ou MALD, alors qu'une diminution drastique du nombre des cellules germinales (spermatocytes et spermatoïdes) était trouvée simultanément, et ce dès la plus faible dose de traitement, soit 35 mg/kg *per os* ou en *i.v.* pour EGME et 20 mg/kg pour MALD.

Les résultats des essais micronoyaux sur les cellules de moelle osseuse *in vivo* sont négatifs, alors que tous les essais *in vitro* sont positifs.

Des dommages à l'ADN de cellules de moelle osseuse et de cellules testiculaires ont néanmoins été mis en évidence avec le test des comètes par Anderson et coll. (1996). Ces altérations génomiques étaient plus marquées sur les cellules testiculaires, mais sont apparues transitoires, disparaissant après 5 semaines de traitement.

Une répartition des éthers de glycol dans l'organisme, différente selon les tissus, pourrait expliquer la toxicité moins élevée au niveau de la moelle osseuse que sur les systèmes reproducteurs. L'éventualité d'une fixation préférentielle des éthers de glycol au niveau testiculaire, ou d'une métabolisation plus importante dans ce tissu a été étudiée par Au et coll. (1996) ; mais les résultats n'ont pas confirmé ces hypothèses.

Les essais de cytogénétique sur cellules de moelle osseuse dans les études de McGregor et coll. (1983) se sont révélés positifs chez certains lots d'animaux,

mâles ou femelles, avec EGME et DEGME. Les intoxications ont été réalisées par inhalation, ce qui peut expliquer la toxicité observée ici au niveau de la moelle osseuse, l'inhalation pouvant augmenter la biodisponibilité de la substance testée.

Les travaux de McGregor et coll. (1983) ont montré que le produit de condensation de l'EGME, à savoir le DEGME, présentait le même profil de toxicité que la substance simple, avec une activité moindre toutefois sur le rat et la drosophile.

Une réversibilité des effets sur la fertilité a été notée également par ces auteurs. L'atteinte de la fertilité survient rapidement dès la concentration d'inhalation de 300 ppm pour EGME et 1 000 ppm pour DEGME, mais une récupération totale a été observée 13 semaines après la fin de l'exposition (McGregor et coll., 1983 ; McGregor, 1984).

Essais de cancérogénicité des éthers de glycol

La cancérogénicité des éthers de glycol a fait l'objet de peu d'études. Les expérimentations à long terme chez le rat Fischer 344/N et la souris B6C3F1, traités par gavage avec l'EGEE pendant deux ans n'ont pas révélé de potentiel cancérogène. L'étude a confirmé les effets d'atrophie testiculaire chez les mâles et mis en évidence des ulcérations stomacales (Melnick, 1984).

La cancérogénicité de l'EGBE a été mise en évidence lors de l'étude de deux ans par inhalation lancée plus récemment par le NIEHS (NTP 1998). Une augmentation dose dépendante de l'incidence d'hémangiosarcomes hépatiques a été notée chez les souris mâles B6C3F1 exposées à des concentrations de 61 et 125 ppm. Chez les souris femelles, les lésions se situaient au niveau stomacal et se traduisaient par des papillomes et carcinomes dont l'incidence s'accroissait avec les niveaux d'exposition. Aucune évidence d'effet cancérogène n'apparaissait chez les rats Fischer 344/N.

En conclusion, les éthers de l'éthylène glycol ne sont pas intrinsèquement mutagènes ou clastogènes, mais certains induisent une aneuploïdie et une instabilité génomique qui pourraient rendre compte de leur toxicité sur la reproduction. Le classement de ces dérivés par ordre de génotoxicité décroissante place l'EGBE en tête, suivi de l'EGEE, puis de l'EGME. Ce résultat est cohérent avec le potentiel cancérogène de l'EGBE, alors que l'EGEE n'est pas classé. À notre connaissance, il n'y a pas eu d'étude de cancérogénicité de l'EGME.

Les éthers de l'éthylène glycol exerceraient leur toxicité par l'intermédiaire de leurs métabolites aldéhydiques et acides. Ces métabolites sont actifs à des concentrations respectivement cent et dix fois plus faibles que les dérivés

initiaux. Les métabolites les plus actifs sont ceux dont la chaîne carbonée est la plus courte, le MALD étant le plus génotoxique des métabolites étudiés.

Peu d'études publiées sont encore disponibles sur les dérivés du propylène glycol. Mais il est intéressant de noter qu'aucun caractère génotoxique notable n'a été obtenu avec les substances testées, à savoir le 2PG1ME, le 2PG1BE et le DPG1BE.

Ces études de génotoxicité ont soulevé un certain nombre de questions relatives aux impuretés et aux effets d'interaction des éthers de glycol. Si les impuretés peuvent accentuer la génotoxicité des dérivés utilisés dans les recherches expérimentales, que penser des produits commerciaux dont la pureté est incontestablement plus médiocre ?

Les effets de synergie mentionnés entre les éthers de glycol et d'autres substances toxiques ou génotoxiques mériteraient de plus amples investigations. Leur implication sur les systèmes de réparation de l'ADN et les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, de la division et de la différenciation cellulaire est probable et nécessiterait des études complémentaires. Les relations éventuelles entre l'aneuploïdie, la formation de micronoyaux, le métabolisme de la tubuline et la toxicité sur la reproduction ou le développement demanderaient aussi à être mieux documentées.

BIBLIOGRAPHIE

- AARDEMA MJ, ALBERTINI S, ARNI P, HENDERSON LM, KIRSCH-VOLDERS M et coll. Aneuploidy : a report of an ECETOC task force. *Mutat Res* 1998, **410** : 3-79
- ANDERSON D, DHAWAN A, YU TW, PLEWA MJ. An investigation of bone marrow and testicular cells in vivo using the comet assay. *Mutat Res* 1996, **370** : 159-174
- ARASHIDANI K, KAWAMOTO T, KODAMA Y. Induction of sister-chromatid exchange by ethylene glycol monomethylether and its metabolite. *Ind Health* 1998, **36** : 27-31
- AU WW, MORRIS DL, LEGATOR MS. Evaluation of the clastogenic effects of 2-methoxyethanol in mice. *Mutat Res* 1993, **300** : 273-279
- AU WW, AHMED AE, CHIEWCHANWIT T, HSIE W, MA H, MOSLEN MT. Toxicity and genotoxicity of 2-methoxyethanol in vitro and in vivo. *Occup Hyg* 1996, **2** : 177-186
- BASLER A. Aneuploidy-inducing chemicals in yeast evaluated by the micronucleus test. *Mutat Res* 1986, **174** : 11-13
- BERTE F, BIANCHI A, GREGOTTI C, BIANCHI L, TATEO F. In vivo and in vitro toxicity of carbitol. *Boll Chim Farm* 1986, **125** : 401-403
- CHIEWCHANWIT T, AU WW. Cytogenetic effects of 2-methoxyethanol and its metabolite, methoxyacetaldehyde, in mammalian cells in vitro. *Mutat Res* 1994, **320** : 125-132
- CHIEWCHANWIT T, MA H, EL ZEIN R, HALLBERG L, AU WW. Induction of deletion mutations by methoxyacetaldehyde in Chinese hamster ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutat Res* 1995, **335** : 121-128

CHIEWCHANWIT T, AU WW. Mutagenicity and cytotoxicity of 2-butoxyethanol and its metabolite, 2-butoxyacetaldehyde, in Chinese hamster ovary (CHO-AS52) cells. *Mutat Res* 1995, **334** : 341-346

DHALLUIN S, ELIAS Z, POIROT O, GATE L, PAGES N et coll. Apoptosis inhibition and ornithine decarboxylase superinduction as early epigenetic events in morphological transformation of Syrian hamster embryo cells exposed to 2-methoxyacetaldehyde, a metabolite of 2-lethoxyethanol. *Toxicol Lett* 1999, **105** : 163-175

ELIAS Z, DANIERE MC, MARANDE AM, POIROT O, TERZETTI F, SCHNEIDER O. Genotoxic and/or epigenetic effects of some glycol ethers : results of different short-term tests. *Occup Hyg* 1996, **2** : 187-212

ELLIOTT BM, ASHBY J. Review of the genotoxicity of 2-butoxyethanol. *Mutat Res* 1997, **387** : 89-96

FOSTER PMD, CREAMY DM, FOSTER JR, THOMAS LV, COOK MW, GANGOLLI SD. Testicular toxicity of ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983, **69** : 385-399

FOSTER PMD, CREAMY DM, FOSTER JR, GRAY TJB. Testicular toxicity produced by ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. *Environ Health Perspect* 1984, **57** : 207-217

FOSTER PMD, BLACKBURN DM, MOORE RB, LLYOD S. Testicular toxicity of 2-methoxyacetaldehyde, a possible metabolite of ethylene glycol monomethyl ether in the rat. *Toxicol Lett* 1986, **32** : 73-80

FOSTER PMD, LLYOD SC, BLACKBURN DM. Comparison of the in vivo and in vitro testicular effects produced by methoxy-, ethoxy- and N-butoxy acetic acids in the rat. *Toxicology* 1987, **43** : 17-30

GOLLAPUDI B, LINScombe VA, MCCLINTOCK ML, SINHA AK, STACK CR. Toxicology of diethylene glycol butyl ether : 3. Genotoxicity evaluation in an in vitro gene mutation assay and an in vivo cytogenetic Test. *J Am Coll Toxicol* 1993, **12** : 155-160

GOLLAPUDI BB, BARBER ED, LAWLOR TE, LEWIS SA. Re-examination of the mutagenicity of ethylene glycol monobutyl ether to Salmonella tester strain TA97a. *Mutat Res* 1996, **370** : 61-64

GRAY TJ, MOSS EJ, CREAMY DM, GANGOLLI SD. Studies on the toxicity of some glycol ethers and alkoxyacetic acids in primary testicular cell cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985, **79** : 490-501

GRAY TJ. Testicular toxicity in vitro : sertoli-germ cell co-cultures as a model system. *Food Chem Toxicol* 1986, **24** : 601-605

GROSCHERL-STEWART U, MAYER VW, TAYLOR-MAYER RE, ZIMMERMANN FK. Aprotic polar solvents inducing chromosomal malsegregation in yeast interfere with the assembly of porcine brain tubulin in vitro. *Mutat Res* 1985, **149** : 333-338

GUZZIE PJ, SLESINSKI RS, HENGLER WC, TYLER TR. Assessment of 2-ethoxyethanol for genotoxicity using a battery of in vitro and in vivo test systems. *Environ Mutagen* 1986, **8** : 33

HOFACK JC, LAMBOLEZ L, ELIAS Z, VASSEUR P. Mutagenicity of ethylene glycol ethers and of their metabolites in Salmonella typhimurium his^r. *Mutat Res* 1995, **341** : 281-287

HOFACK JC, DURAND MJ, POIRIER GG, MAUL A, VASSEUR P. Alteration in methylmethanesulfonate-induced poly(ADP-ribosyl)ation by 2-butoxyethanol in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 1997, **18** : 2333-2338

HOFACK JC, VASSEUR P, POIRIER GG. Glycol ethers induce death and necrosis in human leukemia cells. *Biochem Cell Biol* 1998, **75** : 415-425

KEITH G COULAIS C, EDORH A, BOTTIN C, RIHN B. Ethylene glycol monobutyl ether has neither epigenetic nor genotoxic effects in acute treated rats abd in subchronic treated v-HA-ras transgenic mice. *Occup Hyg* 1996, **2** : 237-249

KVELLAND I. Bief report : the mutagenic effect of five oil dispersants and of ethyleneglycolmonobutylether in bacteriophage T4D. *Hereditas* 1988, **109** : 149-150

LI LH, WINE RN, CHAPIN RE. Sertoli cells mediate germ cell apoptosis induced by 2-methoxyethanol. *Toxicologist* 1996, **30** : 122-122

LOCH CARUSO R, TROSKO JE, CORCOS IA. Interruption of cell-cell communication in Chinese hamster V79 cells by various alkyl glycol ethers : Implications for teratogenicity. *Environ Health Perspect* 1984, **57** : 119-123

MA H, AN J, HSIE AW, AU WW. Mutagenicity and cytotoxicity of 2-methoxyethanol and its metabolites in Chinese hamster cells (the CHO/HPRT and AS52/GPT assays). *Mutat Res* 1993, **298** : 219-225

MEBUS CA, WELSCH F. The possible role of one-carbon moieties in 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid-induced developmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989, **99** : 98-109

MCGREGOR DB, WILLINS MJ, MCDONALD P, HOLMSTROM M, MCDONALD D, NIEMEIER RW. Genetic effects of 2-methoxyethanol and bis(2-methoxyethyl)ether. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983, **70** : 303-316

MCGREGOR DB. Genotoxicity of glycol ethers. *Environ Health Perspect* 1984, **57** : 97-103

MELNICK RL. Toxicities of ethylene glycol and ethylene glycol monoethyl ether in Fischer 344/N rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect* 1984, **57** : 147-155

MILLER RR, CARREON RE, YOUNG JT, MCKENNA MJ. Toxicity of methoxyacetic acid in rats. *Fundam Appl Toxicol* 1982, **2** : 158-160

MOSS EJ, THOMAS LV, COOK MW, FOSTER PMD, CREASY D, GRAY TJB. The role of metabolism in 3-methoxyethanol-induced testicular toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985, **79** : 480-489

NAGANO K, NAKAYAMA E, KOYANO M, OOBAYASHI H, ADACHI H, YAMADA T. Testicular atrophy of mice induced by ethylene glycol mono alkyl ethers. *Sangyo Igaku - Jap J Ind Health* 1979, **21** : 29-35

NTP (National Toxicology Program). Toxicology and Carcinogenesis studies of 2-butoxyethanol (CAS N° 111-76-2) in F344 rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). 1998. NTP TR-484 NIH Publication N°98-3974

STEDMAN DB, WELSCH F. Inhibition of DNA synthesis in mouse whole embryo culture by 2-methoxyacetic acid and attenuation of the effects by simple physiological compounds. *Toxicol Lett* 1989, **45** : 111-117

THOMPSON ED, COPPINGER WJ, VALENCIA R, LAVICOLI J. Mutagenicity testing of diethylene glycol monobutyl ether. *Environ Health Perspect* 1984, **57** : 105-112

TROSKO JE, CHANG CC, NETZLOFF M. The role of inhibited cell-cell communication in teratogenesis. *Teratog Carcinog Mutagen* 1982, **2** : 31-45

TUCKER JD, AULETTA A, CIMINO MC, DEARFIELD KL, JACOBSON-KRAM D et coll. Sister-chromatid exchange : second report of the Gene-Tox program. *Mutat Res* 1993, **297** : 101-180

VILLALOBOS-PIETRINI R, GOMEZ-ARROYO S, ALTAMIRANO-LOZANO M, OROZCO P, RIOS P. Cytogenetic effects of some cellosolves. *Rev Int Contam Ambient* 1989, **5** : 41-48

WELSCH F, STEDMAN DB. Inhibition of metabolic cooperation between Chinese hamster V79 cells by structurally diverse teratogens. *Teratog Carcinog Mutagen* 1984a, **4** : 285-301

WELSCH F, STEDMAN DB. Inhibition of intercellular communication between normal human embryonal palatal mesenchyme cells by teratogenic glycol ethers. *Environ Health Perspect* 1984b, **57** : 125-133

WILEY FH, HUEPER WC, BERGEN DS, BLOOD FR. The formation of oxalic acid from ethylene glycol and related solvents. *J Ind Hyg Toxicol* 1938, **20** : 269-277

ZIMMERMANN FK, MAYER VW, SCHEEL I, RESNICK MA. Acetone, methyl ethyl ketone, ethyl acetate, acetonitrile and other polar aprotic solvents are strong inducers of aneuploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 1985, **149** : 339-351